

78. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. Two new genes controlling the constitutive acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Mol. Gen. Genet.*, 1975, vol. 141, N 1, p. 81—83.
79. Toh-e A., Nakamura H., Oshima Y. A gene controlling the synthesis of non-specific alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, vol. 428, p. 182—192.
80. Toh-e A., Oshima Y. Characterization of dominant, constitutive mutation PHOO for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1974, vol. 120, N 2, p. 608—617.
81. Toh-e A. e. a. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1973, vol. 113, N 2, p. 727—738.
82. Tonino G. J. M., Stein-Parve E. P. Localization of some phosphatase in yeast. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, vol. 67, p. 453.
83. Trotman P., Greenwood S. Effects of zinc and other metal ions on the stability and activity of *E. coli* alkaline phosphatase. — *Biochem. J.*, 1971, vol. 124, N 1, p. 25.
84. Ueda Y., Oshima Y. A constitutive mutation, *phoT*, of the repressible acid phosphatase synthesis with inability to transport inorganic phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Mol. Gen. Genet.*, 1975, vol. 136, N 3, p. 255—259.
85. Ueda Y., Toh-e A., Oshima Y. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 122, N 3, p. 911—922.
86. Weimberg R. Recovery of exocellular acid phosphatase activity on *Saccharomyces mellis* after treatment of the organism with reagent that affects the cell surface. — *J. Bacteriol.*, 1971, vol. 108, N 3, p. 1097—1106.
87. Weimberg R., Orton W. L. Repressible acid phosphomonoesterase and constitutive pyrophosphatase of *Saccharomyces mellis*. — *J. Bacteriol.*, 1963, vol. 86, p. 805.
88. Weimberg R., Orton W. L. Elution of exocellular enzymes from *Saccharomyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1966, vol. 91, N 1, p. 1.
89. Wilkins A. S. Physiological factors in the regulation of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. — *J. Bacteriol.*, 1972, vol. 110, p. 616—623.
90. Willsky G. R., Bennet R. L., Malamy M. H. Inorganic phosphate transport in *E. coli*: Involvement of two genes which play role in alkaline phosphatase regulation. — *J. Bacteriol.*, 1973, vol. 113, N 2, p. 528—539.
91. Willsky G. R., Malamy M. H. The role of the *phoS* periplasmic protein leads to a change in the specificity of a constitutive inorganic transport system in *Escherichia coli*. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, vol. 60, N 1, p. 226—233.
92. Wilson R. W. Acid and alkaline phosphatase in *Schizophyllum commune*. — *Can. J. Microbiol.*, 1972, vol. 18, p. 694—695.
93. Yagil E., Bracha M., Lifshitz Y. The regulatory nature of the *phoB* gene for alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1975, vol. 137, p. 11—16.
94. Yoneda Y., Maruo B. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of  $\alpha$ -amylase and protease, and its synergistic effect. — *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 124, N 1, p. 48—54.
95. Yoshida H., Hanamitsu K. Acid phosphatases from *Fusarium moniliforme*. II. Further studies on substrate specificity and mode of action of acid phosphatase II. — *J. Biochem.*, 1972, vol. 72, p. 49—55.
96. Yoshida H., Tamiya N. Acid phosphatase from *Fusarium moniliforme*. — *J. Biochem.*, 1971, vol. 69, N 3, p. 525.

## АНАЛИЗ МЕЖАЛЛЕЛЬНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ГОМОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ДРОЖЖЕЙ

В. Л. ТИХОМИРОВА, Б. В. СИМАРОВ

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Явление межаллельной комплементации (МАК) заключается в частичном или полном восстановлении «дикого» фенотипа при объединении в генотипе гибрида двух мутантных аллелей одного гена (1, 2). Общепринято, что механизм МАК состоит во взаимодействии идентичных,

по-разному поврежденных субъединиц в молекуле фермента-мультимера (1,2,6). При этом возможно исправление конформационного изменения одной субъединицы под действием гомологичного нормального участка другой субъединицы — позитивная МАК и порча нормальной субъединицы под действием мутантной — негативная МАК.

Результаты теста на комплементацию можно представить в виде веронной карты комплементации [7]. Такая карта дает возможность сравнить внутригенное распределение мутаций, индуцированных различными мутагенами [3]. Оказалось возможным использовать такой подход также для изучения гомологии генов. С этой целью необходимо у сравниваемых штаммов дрожжей сопоставить распределение мутаций, индуцированных одним и тем же мутагеном в одном и том же гене [4]. Одним из возможных объяснений обнаруженного в этом случае различия может служить дивергенция генетического материала данного гена у сравниваемых штаммов.

Еще одним подходом к изучению гомологии генов является исследование негативной комплементации, которое можно определить в частности путем сопоставления МАК у диплоидных и триплоидных гибридов [5, 8—10]. Величина измеряемой этим способом негативной МАК определяется активностью гибридных молекул у диплоидов. Чем ниже активность фермента у диплоидов, тем больше величина негативной комплементации. Следовательно, определив величину негативной комплементации, можно грубо оценить активность фермента у диплоидных гибридов. Если в скрещивание брать мутанты, полученные у «диких» штаммов дрожжей, принадлежащих к одному виду, но имеющих независимое происхождение, то в случае дивергенции данного гена у сравниваемых штаммов мы можем ожидать ослабления диплоидной МАК по сравнению с тем, что наблюдаем при скрещивании мутантов, полученных у одного штамма. Это ослабление диплоидной комплементации можно оценить по величине негативной комплементации.

Целью нашей работы было изучение возможности использования позитивной и негативной МАК в локусе *ade2* для изучения дивергенции генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Предварительные результаты были опубликованы нами ранее [4, 5].

**Материалы и методы.** В работе использованы три штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* независимого происхождения — 768, 41 и 15В-П4. Штаммы 768 и 41 получены из Всесоюзной коллекции микроорганизмов и идентифицированы как дрожжи *S. cerevisiae* [11]. Штамм 15В-П4 принадлежит к Петергофской генетической коллекции дрожжей *S. cerevisiae* [12].

Эти штаммы различаются жизненным циклом: штаммы 768 и 41 гомоталличные, а штамм 15В-П4 гетероталличный. Мутанты, выделенные у всех штаммов, хорошо скрещиваются. Полученные гибриды высоко фертильны и дают нормальное расщепление в тетрадном анализе по исследуемым маркерам, включая признак гомоталлизма [13, 14].

При изучении триплоидной комплементации в 137 комбинациях скрещиваний, благодаря наличию дополнительных мутаций ауксотрофности у скрещиваемых штаммов, мы имели возможность контролировать наличие копуляции. Оказалось, что гибридизация произошла в 135 комбинациях скрещиваний (98,5%), что не выходит за пределы обычного требования надежности в биологических исследованиях.

Для работы мы использовали веронные тестеры штамма 15В-П4. Генотип штаммов — веронных тестеров —  $a$  и  $\alpha$  *ade2-x metA1*, где  $a$  и  $\alpha$  аллели локуса типа спаривания;  $x$  — одноверонные мутации 209, 139, 222, 57, 237, 191 [7]; *ade* и *met* — мутации, приводящие к потребности в аденине и метионине. В более ранних работах [15, 16] можно найти

состав используемых сред. Метод гибридизации гомо- и гетероталлических дрожжей описан в наших предыдущих сообщениях [4, 5].

При получении мутантов у гомоталлических штаммов происходит самодиплоидизация гаплоидных спор, получивших мутацию. Поэтому, скрещивая с веронными тестерами штамма 15В-П4 одни и те же мутанты *ade2* штаммов 768 и 41, находящиеся в гапло- и диплофазе, мы имели возможность сравнивать МАК у изогенных диплоидных и триплоидных гибридов.

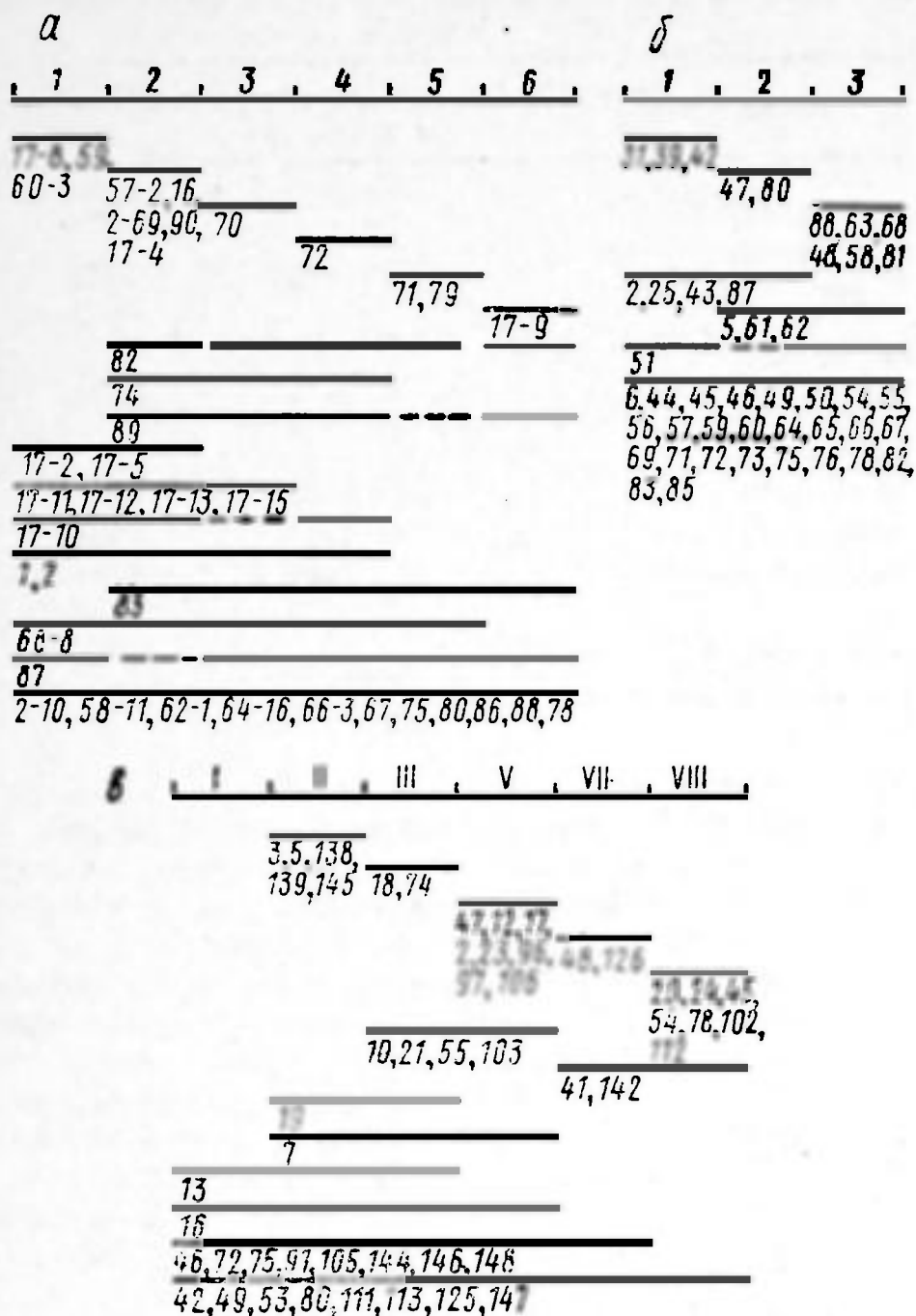


Рис. 1. Веронные карты комплементации локуса *ade2* штаммов 768 (а), 41 (б) и 15В-П4 (в).

Пояснения в тексте.

**Результаты.** Диплоидная комплементация в локусе *ade2*. У штаммов 768 и 41 под действием УФ-лучей мы получили коллекцию мутантов *ade2* [4]. У штамма 768 было получено 40 мутантов по локусу *ade2*, у штамма 41—45 мутантов. Скрещивая эти мутанты во всех возможных сочетаниях, мы изучили диплоидную комплементацию в локусе *ade2* у штаммов 768 и 41. При анализе полученных матриц комплементации мы выбрали для штаммов 768 и 41 набор мутантов, комплементирующих друг с другом во всех возможных сочетаниях, т. е. штаммы — ве-

ронные тестеры. Результаты скрещивания мутантов *ade2* с веронными тестерами представлены на рис. 1. Порядок веронов на картах определяли с помощью матриц связи [2]. На этом же рисунке для сравнения представлена карта комплементации мутантов *ade2*, индуцированных УФ-лучами, у штамма 15В-П4. Здесь и далее данные для штамма 15В-П4 взяты из работ [7, 17].

Таблица 1

Свойства мутантов *ade 2* штаммов 15В-П4, 768 и 41, полученных под действием УФ-света

Адениновые мутанты	Штаммы		
	15В-П4*	768	41
Всего мутантов <i>ade 2</i>	52	39	45
Соотношение $\frac{ade\ 2}{ade\ 2 + ade\ 1}$	0,74	0,78	0,83
Доля четких мутантов среди мутантов <i>ade 2</i>	0,78	0,80	0,79
Одноверонные мутации	19 (36,6)**	13 (33,4)	11 (24,5)
Некомплементирующие мутации	8 (15,4)	11 (28,2)	26 (57,8)
Мутации, имеющие нелинейное функциональное повреждение	1 (1,9)	4 (10,3)	1 (2,2)
Мутанты, стимулируемые $CO_2$ ***	5 (9,6)	3 (7,7)	1 (2,2)
Мутанты, ингибируемые $CO_2$ *	1 (1,9)	1 (2,6)	1 (2,2)
Мутации, супрессируемые Sup 5	7 (13,5)	8 (20,5)	6 (13,3)

\* Данные о штамме 15В-П4 взяты из работ [7, 17].

\*\* В скобках указан процент от общего числа мутантов *ade 2*.

\*\*\* Рост мутантов при повышенной концентрации  $CO_2$  проверен Михайловой и Сойдла [18].

Свойства мутантов *ade2* трех сравниваемых штаммов приведены в табл. 1, из которой следует, что эти штаммы не различаются по соотношению мутантов *ade2* и *ade1* среди выделенных накапливающих красный пигмент аденинзависимых мутантов, по соотношению четких и нечетких мутантов среди мутантов *ade2*, а также и по всем другим сравниваемым показателям за исключением частоты возникновения некомплементирующих мутантов. У штамма 41 частота возникновения некомплементирующих мутантов достоверно выше, чем у штамма 768 ( $F_{эк} > F_{ст} 0,01$ ) и у штамма 15В-П4 ( $F_{эк} > F_{ст} 0,001$ ). Однако более подробно сопоставление этих веронных карт по распределению мутаций невозможно, так как у веронных тестеров штаммов 768, 41 и 15В-П4 мутациями могут быть маркированы различные участки гена, а взаимное расположение мутаций, маркирующих вероны у разных штаммов, неизвестно.

Для того чтобы сравнить распределение мутаций у штаммов 768, 41 и 15В-П4, мы изучили комплементацию мутантов *ade2* штаммов 768 и 41 с веронными тестерами штамма 15В-П4. Карты диплоидной комплементации, полученные при этом, можно видеть на рис. 2. Аналогичная карта, полученная при скрещивании мутантов *ade2* штамма 15В-П4 с веронными тестерами штамма 15В-П4, приведена на рис. 1. На основе этих карт комплементации мы сопоставили распределение мутаций, индуцированных УФ-лучами, по гену *ade2* у штаммов 768, 41 и 15В-П4. Для этого мы определили число мутаций, перекрывающих каждый верон, у штаммов 768, 41 и 15В-П4. За единицу принимали мутацию, и если мутация перекрывала  $n$  веронов, то считали, что на каждый верон приходится  $1/n$  мутации [3, 7]. Полученные результаты представлены в виде графика на рис. 3. Цифры для штамма 768 отличаются

от тех, которые были опубликованы ранее [4], так как в данном случае в качестве делителя мы взяли не общее число мутантов, испытанных в тесте на комплементацию, а число мутантов, проявляющих некомплементарность одному или нескольким веронным тестерам, и отбросили мутанты, комплементарные всем веронным тестерам.

Сравнение трех штаммов по распределению мутаций на картах комплементации локуса *ade2* показало, что штамм 768 достоверно отличается от штаммов 41 и 15В-П4 ( $F_{\text{эк}} > F_{\text{ст}0,05}$ ) в обоих случаях по частоте мутационных изменений, перекрывающих VIII верон.

Однако наиболее убедительно различие в распределении мутаций у трех сравниваемых штаммов удалось доказать при анализе распределения по веронным картам одноверонных мутаций. С этой целью мы прежде всего определили взаимное расположение веронов у штаммов 768, 41 и 15В-П4 (рис. 4) путем сравнения расположения мутаций на картах комплементации (рис. 1 и рис. 2). На рис. 4 тремя горизонтальными линиями изображен ген *ade2* сравниваемых штаммов. Цифры над линиями обозначают порядковые номера веронов штаммов 768, 41 и 15В-П4. Взаимное расположение цифр отражает взаимное расположение веронов разных штаммов. Вертикальными линиями мы разделили ген *ade2* на три участка. Границы участков выбрали, ориентируясь на вероны штамма 768. Первый участок расположен левее 1-го верона штамма 768, а третий участок правее 6-го верона штамма 768. Сравнивая распределение веронов по этим трем участкам у разных штаммов, мы прежде всего видим, что у штамма 768 все вероны расположены во втором участке. Следовательно, в первом и третьем участках гена не возникает миссенс-мутаций, способных служить тестерами веронов. В табл. 2 мы приводим результаты сопоставления распределения одноверонных мутаций внутри гена *ade2* по этим трем участкам, сопоставимым для

штаммов 768, 41 и 15В-П4. Сравнение показало достоверное различие в распределении одноверонных мутаций у штамма 768, с одной стороны, и штаммов 41 и 15В-П4 — с другой. Причем важно отметить, что в первом и третьем участках гена *ade2* частота возникновения одноверонных мутаций у штамма 768 ниже, чем у штаммов 41 и 15В-П4, а во втором участке значительно выше, так что суммарная частота воз-

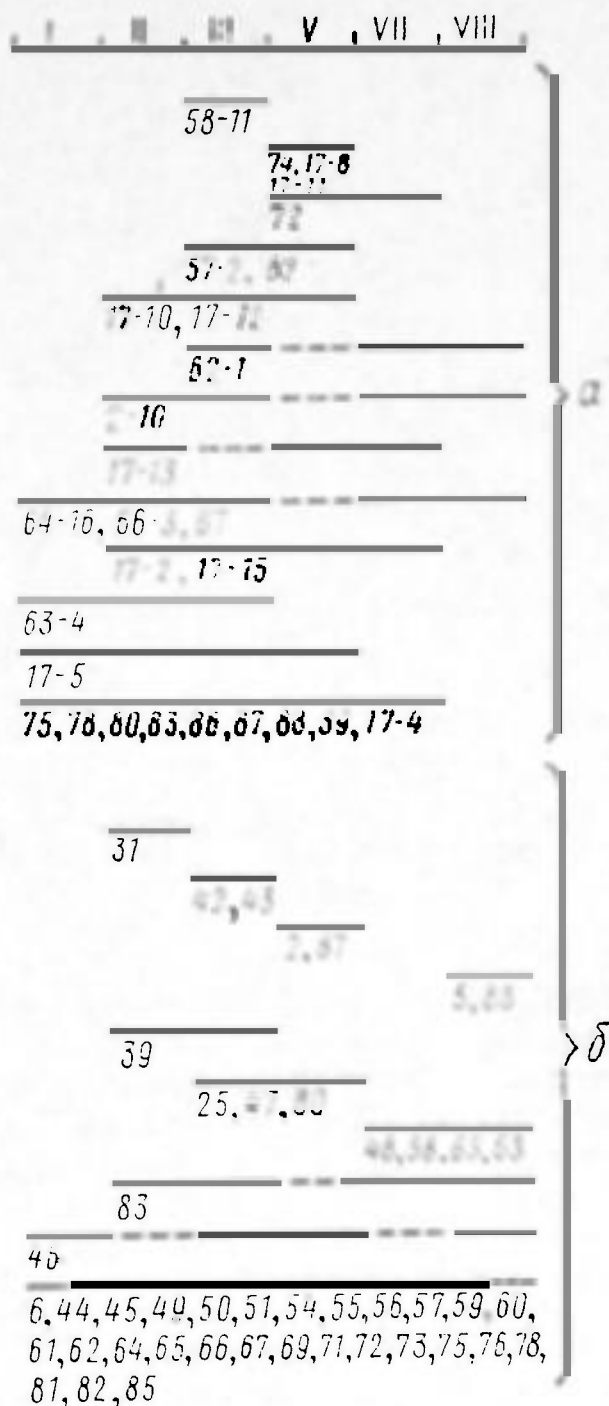


Рис. 2. Карты диплоидной комплементации локуса *ade2*, полученные при скрещивании веронных тестеров штамма 15В-П4 с мутантами *ade2* штамма 768 (а) и 41 (б).

Пояснения в тексте.



никновения одноверонных мутаций у штаммов 768, 41 и 15В-П4 одинакова.

2. Триплоидная комплементация в локусе *ade2* и величина негативной комплементации. Триплоидную комплементацию в локусе *ade2* мы

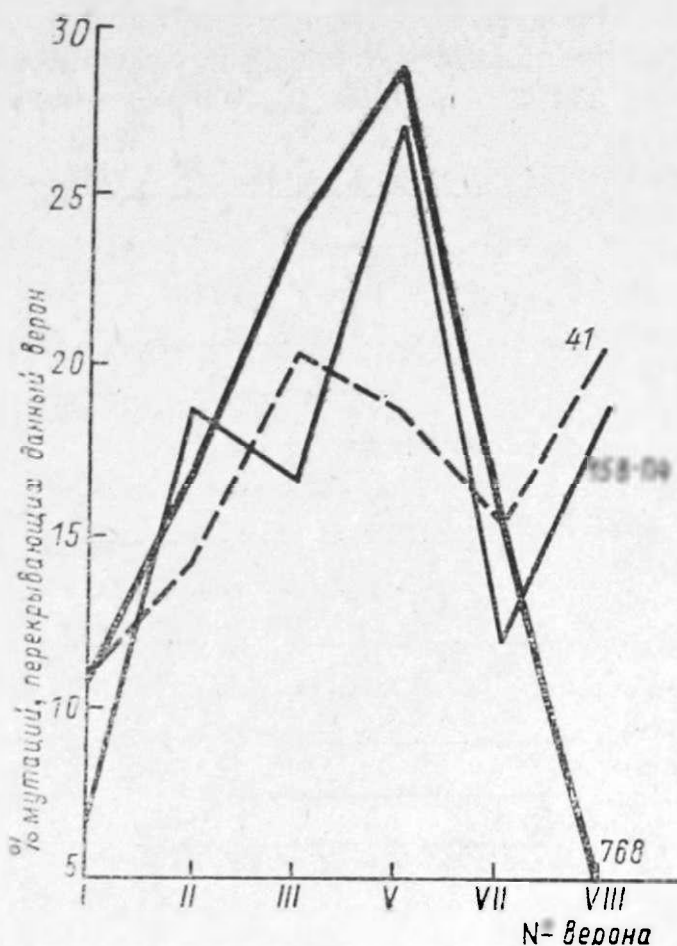


Рис. 3. Распределение мутаций по локусу *ade2* у штаммов 768, 41 и 15В-П4.

Пояснения в тексте.

в данном случае различие в комплементации у диплоидных и триплоидных гибридов не столь значительно. Частота комплементации у диплоидных гибридов равна 26% (71 из 270), а у триплоидов — 24% (64 из 270). Снижение частоты комплементации у триплоидных гибридов по сравнению с диплоидными мы объясняем негативной комплементацией. Разное соотношение аллелей у диплоидов и триплоидов — 1:1 и 2:1 соответственно приводит к формированию различного количества активных гибридных молекул в клетке, что и проявляется в ряде случаев в подавлении комплементации у триплоидных гибридов.

Величину негативной комплементации тогда можно определить как частоту «исчезновения» МАК при переходе от диплоидного уровня к триплоидному. Так, комплементация у диплоидных гибридов мутантов *ade2* штаммов 768 и 15В-П4 происхо-

изучали, скрещивая с веронными тестерами штамма 15В-П4 те же самые мутанты *ade2* штаммов 768 и 41, но находящиеся в диплофазе (вегетативные диплоидные клетки). Карты триплоидной комплементации приведены на рис. 5. При сравнении карт диплоидной и триплоидной комплементации обращает на себя внимание то, что МАК у диплоидных гибридов происходит чаще, чем у триплоидных. Так, при скрещивании мутантов *ade2* штаммов 768 и 15В-П4 у диплоидных гибридов мы наблюдали комплементацию в 121 комбинации скрещиваний из 222 (55%), а у триплоидных — в 70 из 222 (32%). Аналогичный результат дало сравнение частот диплоидной и триплоидной комплементации при скрещивании мутантов *ade2* штаммов 41 и 15В-П4, хотя

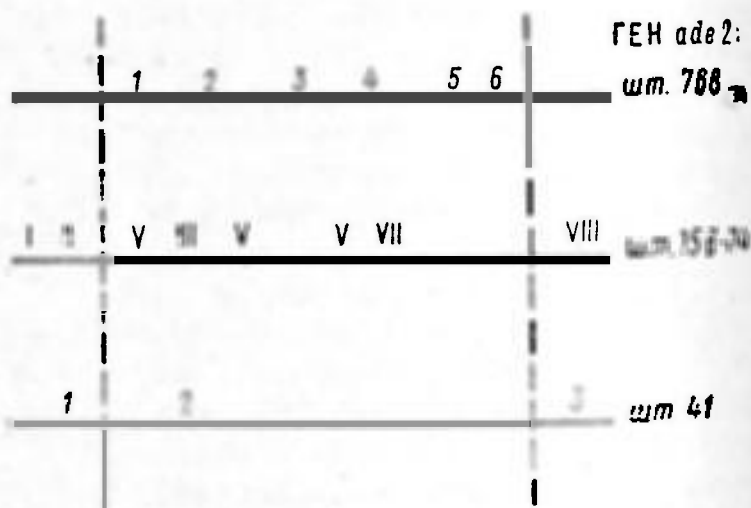


Рис. 4. Расположение веронов у штаммов 768, 41 и 15В-П4 относительно друг друга.

Пояснения в тексте.

дит в 121 комбинации скрещиваний, а у триплоидных гибридов — в 70. Следовательно, при переходе от диплоидного уровня к триплоидному комплементация «исчезает» в 51 комбинации скрещиваний из 121, т. е. величина негативной комплементации равна 42%. Величина негативной комплементации при скрещивании мутантов *ade2* штаммов 41 и 15В-П4 равна только 10%. Сравнение показало, что штаммы 768 и 41 достоверно различаются по величине негативной комплементации ( $F_{\text{эк}} > F_{\text{ст}0,001}$ ).

Таблица 2

Распределение одноверонных мутаций по картам комплементации гена *ade2* у штаммов 768, 41 и 15В-П4

Штамм	Распределение мутации по контролируемым участкам карты комплементации			Всего одноверонных мутаций
	I	II	III	
41	3 (6,7) ↓	2 (4,5) ↓	6 (13,3) ↓	11 (24,5)
768	0 (0) ↓	13 (33,4) ↓	0 (0) ↓	13 (33,4)
15В-П4	5 (9,6)	7 (13,5)	7 (13,5)	19 (36,6)

Примечание. В скобках указан процент от общего числа мутаций;  $\ll - \gg$  — отличие достоверно.

При изучении негативной комплементации мы сравнивали карты диплоидной и триплоидной комплементации, полученные при скрещивании одних и тех же мутантов *ade2*, находящихся в гапло- и диплофазе, с шестью веронными тестерами штамма 15В-П4. Возникает вопрос — одинакова ли величина негативной комплементации при скрещивании мутантов с каждым из веронных тестеров? Для того чтобы ответить на этот вопрос, мы рассчитали частоту «исчезновения» комплементации отдельно для скрещивания мутантов с тестерами каждого верона. Полученные результаты представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что величина негативной комплементации различна при скрещивании мутантов *ade2* как штамма 768, так и штамма 41 с различными веронными тестерами штамма 15В-П4. Поверонное сопоставление величины негативной комплементации приведено в табл. 4. Сравнение показало, что распределение негативной комплементации по веронам при скрещивании с веронными тестерами мутантов *ade2* штаммов 768 и 41 достоверно различается.

**Обсуждение.** Распределение мутационных изменений внутри гена и характер их проявления зависит от последовательности оснований молекулы ДНК. Поэтому, сравнивая распределение мутаций, индуцированных одним и тем же мутагеном, у разных штаммов одного вида можно обнаружить дивергенцию генетического материала. Мы сопоставили распределение мутаций в локусе *ade2* у трех штаммов дрожжей *S. cerevisiae* — 768, 41 и 15В-П4, имеющих независимое происхождение. Для этого мы по веронным картам межallelельной комплементации определили для этих штаммов число мутаций, перекрывающих каждый верон. Оказалось, что штамм 768 отличается от штамма 41 и 15В-П4 по числу мутационных изменений, приходящихся на VII верон.

Однако наиболее четко различие в распределении мутаций у штаммов 768, 41 и 15В-П4 проявилось при сопоставлении распределения одноверонных мутаций. Частота возникновения одноверонных мутаций в

локусе *ade2* у всех трех штаммов одинакова. Однако у штамма 768 в одних частях гена *ade2* одновременных мутаций больше, чем у штаммов 41 и 15В-П4, а в других — меньше. На основе этих данных мы предположили наличие дивергенции генетического материала гена *ade2* у штамма 768, с одной стороны, и штаммов 41 и 15В-П4, с другой.

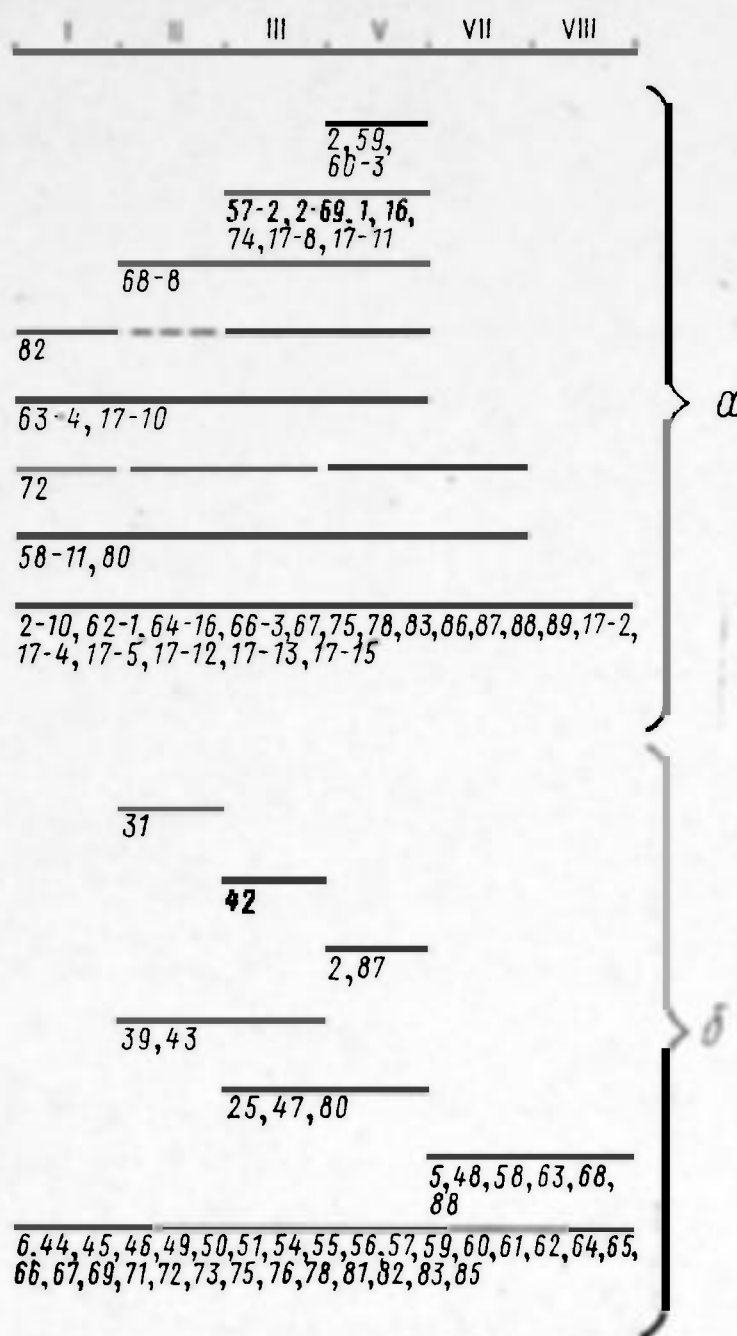


Рис. 5. Карты триплоидной комплементации локуса *ade2*, полученные при скрещивании веронных тестеров штамма 15В-П4 с мутантами *ade2* штаммов 768 (а) и 41 (б).

Пояснения в тексте.

Если при этом исходить из того, что частота мутирования является адаптивным признаком [19, 20], то путь возникновения различий в распределении одноверонных мутаций можно представить себе, например, следующим образом. В гене *ade2* штамма 768 могло произойти мутационное изменение последовательности оснований, которое вызвало изменение частоты мутирования в этом гене. В ответ на это включилось действие естественного отбора, направленное на то, чтобы вернуть частоту мутирования к исходному уровню. Восстановление первоначальной частоты мутирования могло произойти, в частности, в результате возникновения еще одного мутационного изменения в данном гене, направление действия которого на частоту мутирования противоположно действию первой мутации. Таким образом могла возникнуть форма, которая по сравнению с исходной имеет иное распределение мутаций внутри гена, сохраняя при этом неизменной общую частоту мутирования гена.

Дальнейшее сопоставление штаммов 768, 41 и 15В-П4 по спектру возникающих мутаций показало, что штамм 41 отличается от штаммов 768 и 15В-П4 по частоте возникновения некомплементирующих мутаций. Частота возникновения некомплементирующих мутаций у штамма 41 достоверно выше, чем у штаммов 768 и 15В-П4. Обнаруженное нами различие можно объяснить тем, что, во-первых, в гене *ade2* штамма 41 в участке, расположенном ближе к началу трансляции, возник избыток триплетов, способных превращаться в нонсенс-кодоны в результате замены одной пары оснований, во-вторых, в гене *ade2* штамма 41 чаще,



чем в генах *ade2* штаммов 768 и 15В-П4 возникают мутации, препятствующие агрегации субъединиц фермента-мультимера, и, значит, проявляющиеся на карте комплементации как некомплементирующие.

Таким образом, сравнение мутабельности гена *ade2* обнаружило дивергенцию этого гена у трех сравниваемых штаммов. Если это так, то мы вправе ожидать, что при скрещивании мутантов *ade2* разных штаммов активность АИР-карбоксилазы у гибридов будет низкой. Что-

Таблица 3

Негативная комплементация в локусе *ade2* у штаммов 768 и 41 (ее величина и распределение по веронной карте)

№ верона	Кол-во изученных гибридов	Из них проявляют компле- ментацию		$2n - 3n$	$\frac{2n - 3n}{2n}$
		на диплоид- ном уровне ( $2n$ )	на триплоид- ном уровне ( $3n$ )		
Ш т а м м 768					
I	37	23	13	10	0,44
II	37	17	14	3	0,18
III	37	14	6	8	0,57
V	37	16	2	14	0,88
VII	37	19	16	3	0,16
VIII	37	32	19	13	0,41
Σ	222	121	70	51	0,42
Ш т а м м 41					
I	45	16	15	1	0,06
II	45	14	12	2	0,14
III	45	9	9	0	0
V	45	11	10	1	0,09
VII	45	12	9	3	0,25
VIII	45	9	9	0	0
Σ	270	71	64	7	0,10

бы проверить это, мы изучили негативную комплементацию мутантов *ade2* штаммов 768 и 41. Величина негативной комплементации зависит от активности фермента у диплоидных гибридов: чем ниже активность фермента у диплоидов, тем выше негативная комплементация.

Таблица 4

Сравнение распределения негативной комплементации по веронам у штаммов 768 и 41, %

Штамм	№ верона					
	I	II	III	V	VII	VIII
768	20	6	16	27	6	25
41	14	29	0	14	43	0
Сопоставление $F_{эк}$ и $F_{ст}$	$F_{эк} < F_{ст}$	$F_{эк} < F_{ст}$	$F_{эк} > F_{ст} 0,05$	$F_{эк} < F_{ст}$	$F_{эк} > F_{ст} 0,05$	$F_{эк} > F_{ст} 0,05$

Примечание. За 100% принимали число случаев негативной комплементации, которое для штамма 768 равно 51, а для штамма 41 — 7.

Определяя величину негативной комплементации, мы могли сравнить активность фермента у гибридов, полученных при скрещивании мутантов *ade2* разных штаммов. Оказалось, что величина негативной комплементации при скрещивании мутантов штаммов 768 и 15В-П4 достоверно выше, чем при скрещивании мутантов штаммов 41 и 15В-

П4. Это говорит о низкой активности фермента у гибридов, полученных от скрещивания мутантов штаммов 768 и 15В-П4, а значит еще раз подтверждает предположение о дивергенции гена *ade2* у этих двух штаммов. Об этом свидетельствует и неодинаковое распределение негативной комплементации по веронам при скрещивании с веронными тестерами штамма 15В-П4 мутантов *ade2* штаммов 768 и 41. Кроме того, об этом же говорят и результаты изучения частоты возникновения пигментированных гибридов при скрещивании мутантов *ade2* разных штаммов и, наконец, результаты изучения активности и электрофоретической подвижности АИР-карбоксилазы у штаммов 768, 41 и 15В-П4, полученные нами ранее [5].

На основании изложенного можно сделать вывод, что межаллельную комплементацию можно использовать как метод изучения гомологии генетического материала и микроорганизмов.

### Summary

Strains 768 and 41 of *Saccharomyces cerevisiae* were under the study. There were isolated and characterized by means of interallelic complementation test 40 UV — induced *ade2* mutants of the strain 768 and 45 UV — induced *ade2* mutants of the strain 41. Maps obtained were compared with the previously published map for strain 15V—P4. The comparison revealed statistically significant differences in the distribution of mutations and in the frequency of diploid and triploid interallelic complementation. The above differences were interpreted as a divergence of the genetic material of these strains.

The results suggest the interallelic complementation test as an efficient tool useful for the investigation of the divergence of a single locus mutability in microorganisms.

### УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Финчем Дж. Генетическая комплементация. М., 1968. 183 с.
2. Сойдла Т. Р. Функция гена. — В кн.: Физиологическая генетика. М., 1976, с. 5.
3. Коваль А. М., Сойдла Т. Р. Межаллельная комплементация мутаций, индуцированных этилметансульфонатом в локусе *ade2* у дрожжей-сахаромикетов. — Цитол. и генет., 1973, т. 7, № 2, с. 144—149.
4. Симаров Б. В., Тихомирова В. Л. Дивергенция мутабельности гена *ade2* у дрожжей *S. cerevisiae*. — Генетика, 1976, т. 12, № 4, с. 121—129.
5. Симаров Б. В., Тихомирова В. Л., Аронштам А. А. Взаимодействие мутантных аллелей локуса *ade2* у диплоидных и триплоидных гибридов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Генетика, 1979, т. 00, № 00, с. 00—00.
6. Ратнер В. В., Родин С. Н., Шендеров А. Н. Проблема межаллельной комплементации. — Успехи современ. биол., 1975, т. 79, вып. 3, с. 399—419.
7. Сойдла Т. Р., Инге-Вечтомов С. Г., Симаров Б. В. Межаллельная комплементация в локусе *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: Исследования по генетике, вып. 3. Л., 1967, с. 148—163.
8. Reichert U. Gendosiswirkungen in einem *ad<sub>2</sub>* Mutantensystem bei *Saccharomyces cerevisiae*. — Zentralbl. Parasitenk. Infektions. Hyg. Abt. Orig., 1967, vol. 205, N 1—3, p. 63—68.
9. Inge-Vechtomov S. G., Pavlenko V. V. Triallelic complementation and the subunit structure of enzymes. — Nature, vol. 222, p. 1078—1079.
10. Сойдла Т. Р., Тер-Аванесян М. Д., Симаров Б. В. и др. Негативная комплементация в локусе *ade2* у дрожжей-сахаромикетов. — В кн.: Исследования по генетике, вып. 6. Л., 1976, с. 90—108.
11. Соом Я. О. Мутанты *Saccharomyces cerevisiae*, усваивающие n-алканы. I. Выделение и характеристика мутантов. — Генетика, 1973, т. 9, № 12, с. 95—101.
12. Инге-Вечтомов С. Г. Новые генетические линии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1963, № 21, с. 117—125.
13. Инге-Вечтомов С. Г., Симаров Б. В., Рабинович Э. Г. Мутанты дрожжей-сахаромикетов, усваивающие углеводороды. II. Маркирование и гибридизация исходных штаммов. — Генетика, 1974, т. 10, № 9, с. 106—115.
14. Симаров Б. В., Тихомирова В. Л., Рабинович Э. Г., Инге-Вечтомов С. Г. Мутанты дрожжей-сахаромикетов, усваивающие углеводороды. III. Получение полиплоидных форм исходных штаммов. — Генетика, 1974, т. 10, № 9, с. 116—122.
15. Инге-Вечтомов С. Г. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей. — Генетика, 1971, т. 7, № 9, с. 113—124.

16. Соом Я. О., Симаров Б. В. Изучение споруляции у некоторых штаммов *Candida* и *Torulopsis*. — В кн.: Исследования по генетике, вып. 4, Л., 1971, с. 110—116.
17. Инге-Вечтомов С. Г. Структура, функция и взаимодействие генов у дрожжей. Автореф. докт. дис. Л., 1971. 460 с.
18. Михайлова Н. П., Сойдла Т. Р. Влияние повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  *S. cerevisiae*. — Генетика, 1976, т. 12, № 10, с. 118—127.
19. Шапиро Н. И. Мутационный процесс как адаптивный признак вида. — Зоол. журн., т. 17, № 4, 1938, с. 592—601.
20. Drake J. W. Comparative rates of spontaneous mutations. — Nature, 1969, vol. 221, p. 1132.

## ДВЕНАДЦАТИВЕРОННАЯ КАРТА МЕЖАЛЛЕЛЬНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ЛОКУСА *ade2* У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Б. В. ШИЛОВА, Т. Р. СОЙДЛА

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Межаллельная комплементация (МАК) служит основным генетическим подходом для изучения структуры ферментов. Результаты теста на МАК принято изображать в виде карт комплементации. Одна из самых подробных карт была построена для локуса *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, контролирующего фермент АИР-карбоксилазу [1]. На карте было найдено не более 8 мутаций, комплементарных во всех возможных сочетаниях. По основной парадигме МАК это мутации, которые отличаются друг от друга во всех попарных сравнениях и, следовательно, маркируют 8 различных участков в структуре фермента АИР-карбоксилазы. Была построена упрощенная (веронная) карта комплементации, которая показывала комплементарность всех остальных мутаций локуса набору указанных 8 мутаций. По принятой гипотезе при этом регистрируется, какие из 8 различных маркированных таким образом участков в структуре АИР-карбоксилазы изменены мутациями. Единицы комплементации на карте, упрощенной по приведенным правилам, названы веронами. Выбранные мутации, комплементарные между собой во всех сочетаниях, — тестеры соответствующих веронов [1]. Некоторые осложнения с определением и интерпретацией понятия «верон» обсуждаются в той же работе и в дальнейших публикациях [1, 2, 3].

При исследовании индуцированных этилметансульфонатом мутаций [2] были найдены мутации локуса *ade2*, которые оказались комплементарными всем 8 веронным тестерам, т. е. занимали место где-то за пределами 8 маркированных участков на карте. Мы ставили перед собой задачу усовершенствовать систему тестеров для регистрации МАК с тем, чтобы иметь возможность отражать на карте комплементации свойства всех мутаций гена.

**Материал и методы.** Данная работа выполнялась на Петергофских генетических линиях дрожжей, полученных на основе XII расы *Saccharomyces cerevisiae* [4]. При скрещиваниях использовались 650 мутантов по локусу *ade2*, индуцированных воздействием на гаплоид 15В-П4 рентгеновых и УФ-лучей, азотистой кислоты [5, 6], ЭМС [7], а также распада изотопов  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $\beta$ -излучения [8]. Кроме того, использовали веронные тестеры [1], имеющие генотипы  $\alpha\text{ade2-209}$  (I),  $\alpha\text{ade2-139}$  (II),  $\alpha\text{ade2-222}$  (III),  $\alpha\text{ade2-240}$  (IV),  $\alpha\text{ade2-57}$  (V),  $\alpha\text{ade2-163}$  (VI),  $\alpha\text{ade2-237 rgh1-1}$  (VII),  $\alpha\text{ade2-191}$  (VIII). Новые веронные тестеры были получены при скрещивании соответствующих культур генотипа  $\alpha\text{ade2}$  на гаплоид 3А-П488 генотипа  $\alpha\text{metA1}$ . В качестве тестеров на тип спаривания и при тесте на алле-